

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑭ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭56—158746

⑮ Int. Cl.³
C 07 C 103/50
A 61 K 31/165
31/195
31/22
31/255
C 07 C 103/84
149/247
153/017

識別記号
A A C
A A C
A A C
A A C

庁内整理番号
7375—4H
6408—4C
6408—4C
6408—4C
6408—4C
7375—4H
7162—4H
7142—4H

⑯ 公開 昭和56年(1981)12月7日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 16 頁)

⑭ 製薬用アミド

⑰ 特 願 昭56—54256

⑱ 出 願 昭56(1981)4月10日

優先権主張 ⑲1980年4月11日 ⑳イギリス
(GB)㉑8011986

㉒発 明 者 サムエル・ウィルキンソン
イギリス国ケント・ベツケンハ

⑳出 願 人 ム・ベビントン・ロード12
ザ・ウエルカム・ファウンデー
ション・リミテッド
イギリス国ロンドン・エヌ・ダ
ブリユ1 ユーストン・ロード18
3-193

㉓代 理 人 弁理士 浅村皓 外4名

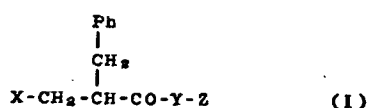
明 細 書

1. 発明の名称

製薬用アミド

2. 特許請求の範囲

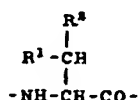
(I) 一般式



(式中 X は Z イオンに対するリガンドとして機能しうる基であり;

Pb はフェニル基であつてこれは場合によつてはハロおよびニトロ基から選ばれる一つまたは一つ以上の置換基によつて置換される;

Y は式:



式中

R¹ は水素またはメチルであり;

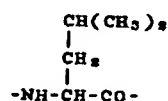
R² は 1 個から 3 個までの炭素原子のアルキルでありまたはメチルチオメチルであり; そして Z は式 -OR² または -NR⁴R⁵ の基であつてそこで R², R⁴ および R⁵ はそれぞれ水素または 1 個から 4 個までの炭素原子のアルキルでありそして R⁵ はさらにそのアルキレン部分中に 1 個から 3 個までの炭素原子を有するフェニルアルキル、またはフェニルであることができる) の化合物および薬理的に受容し得るその塩基性塩。

(2) X がカルボキシルを表わす特許請求の範囲第 (1) 項に記載の化合物。

(3) X がメルカプトまたは 2 個から 5 個までの炭素原子を有するアルカノイルチオを表わす特許請求の範囲第 (1) 項に記載の化合物。

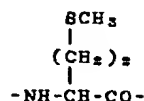
(4) Pb が非置換フェニルである前記特許請求の範囲の何れかの項に記載の化合物。

(5) Y が式



(D-またはL-形態の何れか)の基である前記特許請求の範囲の何れかの項に記載の化合物。

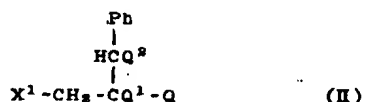
(6) Yが式



(D-またはL-形態の何れか)の基である特許請求の範囲第(1)から第(4)項までの何れかの項に記載の化合物。

(7) Zが式-OHまたは-NH₂の基である前記特許請求の範囲の何れかの項に記載の化合物。

(8) 式



(式中Phは特許請求の範囲第(1)項中に定義する通りであり；X¹は特許請求の範囲第(1)項中に定義するX基であるかまたは機能的に保護されたその誘導体であり；Qはカルボキシルまたは機能的に活性化されたその誘導体であり；そして

に記載の処方物。

(1) 錠剤、カプセル、カシエ-または注射しうる溶液または懸濁液の形における特許請求の範囲第(1)項に記載の処方物。

(2) 哺乳動物の治療上の処置に用いる式(I)(特許請求の範囲第(1)項中に定義する通り)の化合物および薬理学上のその塩基性塩。

(3) 人間の治療上の処置に用いる式(I)(特許請求の範囲第(1)項中に定義する通り)の化合物および薬理学上のその塩基性塩。

(4) 哺乳動物におけるエンケファリンの効果の延長および/または強化のために用いる式(I)(特許請求の範囲第(1)項中に定義する通り)の化合物。

(5) モルヒネ同様の効果を持つ薬剤を必要とする状態に対して哺乳動物の処置に用いる式(I)(特許請求の範囲第(1)項中に定義する通り)の化合物および薬理学上のその塩基性塩。

3. 発明の詳細な説明

本発明はアミド類およびそれらの調製方法、そのような化合物を含む薬剤処方物およびそのよう

特開昭56-158746(2)

Q¹とQ²は共に水素または一緒に結合を形成する)の化合物を式



(式中Yは特許請求の範囲第(1)項中に定義する通りであり；そしてZ¹は特許請求の範囲第(1)項中に定義するZ基であるかまたは機能的に保護されたその誘導体である)の化合物と反応させ；続いて(Q¹およびQ²が一緒に結合を形成する場合には)選択的にその結合を変え、適切な場合には生成物を式(I)(特許請求の範囲第(1)項中に定義する通り)の化合物または薬理学的に受容しうるその塩基性塩に解保護することを含む式(I)の化合物または薬理学的に受容しうるその塩基性塩を調製する方法。

(9) 治療上有効量の式(I)(特許請求の範囲第(1)項中に定義する通りの)の化合物または薬理学的に受容し得るその塩基性塩を受容しうるそれに対する担体と共に含む薬理学的処方物。

(10) 経口の、直腸の、鼻の、局所の、腫のまたは非経口の投与に適合させた特許請求の範囲第(9)項

な処方物の調製方法、人間および獣医用薬剤におけるそのような化合物の使用、およびアミド類の調製において得られる価値のある中間物およびそのような中間物の調製方法に関するものである。

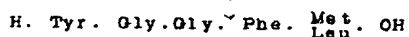
1975年にHughes等は(Nature 258巻、12月18日、1975、577から579頁まで)哺乳動物の脳から強力な麻酔性行動活性を持つ二つの関連したペプチドペプチド即ちエンケファリンを確認した；

H. Tyr. Gly. Gly. Phe. Met. OH(Met⁵-エンケファリン)

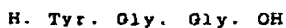
H. Tyr. Gly. Gly. Phe. Leu. OH(Leu⁵-エンケファリン)

(ここに使用するアミノ酸およびそれらの基に対する省略形はこの技術では通例のものでありそして、例えば、Biochemical Journal (1972) 126、773から780頁までに見出せるであろう。上記中および以下の総ての参照文献を通して別記しない限り偏光(chiral)アミノ酸およびそれらの基のL-形態を称する)。

この発見以来エンケファリンは多くの研究者によつてそして種々の研究法によつて研究された。そのような研究法の一つはそれらの不活性化の研究に係りしとして最近の報告〔例えば Malfroy 等、*Nature* 276 巻、11月30日(1978)、523から526頁までおよび Gorenstein 等、*Life Sciences* 25 巻(1979)2065から2070頁まで〕は哺乳類の脳中に Gly³-Phe⁴ 結合を加水分解しうるジペプチジルカルボキシペプチダーゼ(「エンケファリナーゼ」)が存在することを示し：



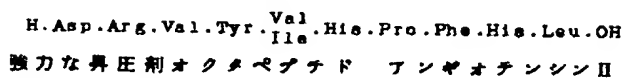
そしてこのようにして生物学的に不活性な N-末端トリペプチド断片を生み出した。即ち：



がそれである。

このようにエンケファリナーゼは哺乳類のアンギオテンシン交換酵素(ACE, EC 3, 4, 15.1)とともに比較しうる役割を有するが後者は比較的の不活性なデカペプチド アンギオテンシン I

の Phe⁸-His⁹ 結合に作用して



強力な昇圧剤オクタペプチド アンギオテンシン II

$$\text{H. Asp. Arg. Val. Tyr. } \overset{\text{Val.}}{\underset{\text{Ile.}}{\text{His.}}} \text{ Pro. Phe. OH}$$
 を遊離する。しかし二つの酵素は別個の種類であることが示されている〔Swerts 等、*European Journal of Pharmacology* 57 巻(1979)279頁から281頁まで〕。

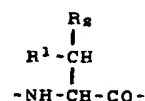
選択的に ACE を抑制することによつてアンギオテンシン I からのアンギオテンシン II の遊離を調節することはしばしば高血圧症の治療に対して可能な方法として認められ、そしてそのような研究法から考案されそして希望する性質を示す多数の薬剤が記述された。一つの特に強力な化合物は 1-(D-3-メルカプト-2-メチルプロパノイル)-L-プロリン(R, S)であり、別名カプトリルまたは BQ 14225 として知られておりそして次の構造を有する：



る基であり；

Ph はフェニル基であつてこれは場合によつてはハロ(即ちフルオロ、クロロ、ブromoまたはイオド)およびニトロから選ばれる一つまたは一つ以上の置換基によつて置換され；

Y は式：



の基であつて式中

R¹ は水素またはメチルであり；

R² は1個から3個までの炭素原子のアルキルでありまたはメチルチオメチルであり；そして

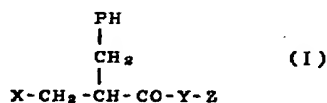
Z は -OR³ または -NR⁴R⁵ であつてそこでは R³, R⁴ および R⁵ はそれぞれ水素または1個から4個までの炭素原子のアルキルでありそして R³ はさらにそのアルキレン部分中に1個から3個までの炭素原子を有するフェニルアルキルまたはフェニルであることができる。

上に定義したような式(I)は多数の非対称中心

これはエンケファリナーゼおよび ACE の両方を抑制することができることと報告されたが(Swerts 等、上記引用文中)しかし前者よりも後者の酵素に対してはるかに大きな特殊性を有するので、ACE を50%抑制するのに要する化合物の濃度はエンケファリナーゼを同程度抑制するのに要する濃度のおよそ1000倍も低い。

本発明は単に有利なエンケファリナーゼ抑制性を有するだけでなく、また BQ 14225 とは違つて ACE に対するよりもずっと大きい特殊性をエンケファリナーゼに対して有する化合物の種類に関するものである。

本発明はこのように式(I)：



をその塩基性塩(即ち式(I)の化合物と塩基との反応によつて形成される塩)と共に提供する。なお式中の

X は2イオンに対するリガンドとして機能しう

を含みそしてそれによつて含まれる光学異性体の数においてそれらの混合物を含むことはいうまでもない。

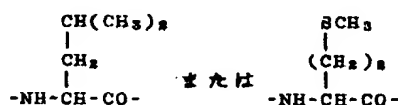
X基に対して選した一義性には2個から5個までの炭素原子を有するアルカノイルチオ、ベンザイルチオ、そのアルキレン部分中に1個から3個までの炭素原子を有するフェニルアルカノイルチオ、カルボキシル、ホルミル、ヒドロキシアミノ、メルカプト、ホスホノおよび(8H)モノチオホスホノ、即ちOH(8H), O, P-を含む。

式(I)のアミドの塩では薬理学的活性はアミド(酸)アニオン中に存在しそして治療目的上は受容体に対して薬理学的にそして製薬学的に許容しうるものであることが望ましいが、カチオンの一義性は重要度が低い。受容し得る塩にはアンモニウム塩、ナトリウムおよびカリウム塩のようなアルカリ金属塩、マグネシウムおよびカルシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、および有機塩基の塩類、例えばジシクロヘキシルアミンまたはアルカノールアミン例えばトリエタノールアミンおよ

びジエチルアミノエチルアミンのようなモノ、ジ-またはトリ-低級アルキルアミンから誘導されるアミン塩およびピペリジン、ピリジン、ピペラジンおよびモルホリンのような複素環式アミンとの塩を含む。

式(I)のアミドのサブクラスとして次のような化合物を挙げるができる：

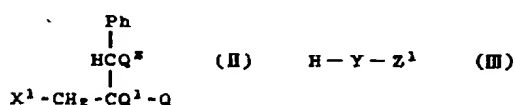
- (i) Xがカルボキシ、アルカノイルチオ(例えばアセチルチオ)またはメルカプトである；
- (ii) Phが置換されていないフェニルである；
- (iii) Yが次式の基である(DまたはL-形態の何れか)：



iv Zが-OHまたは-NH₂である。

式(I)のアミドおよびそれらの塩基性塩は類似構造の化合物の調製についてこの技術で公知の何れの方法によつても調製することができる。従つ

てそれらは試薬(II)を試薬(III)と反応させて調製されるであろう。



そこでは

PhおよびYは式(I)において定義された通りである；

X¹は式(I)中で定義された通りのX基または機能的に保護されたその誘導体である；

Z¹は式(I)中で定義された通りのZ基または機能的に保護されたその誘導体である；

Qはカルボキシルまたは機能的に活性化されたその誘導体である；そして

Q¹およびQ²は共に水素でありまたは一緒に化学結合を形成する；

(Q¹およびQ²が共に化学結合を形成する場合に)その後その結合の選択的還元及び、適切な場合には、生成物の保護解除そして生成物のアミ

ドまたはその塩基性塩への転換が行なわれる。

(II)と(III)との反応はペプチド化学で標準である技術を使用しそしてペプチド合成の古典的方法または固相方法の使用によつて達成される。好適な基の活性化および保護の詳細および好適な反応条件((II)と(III)の反応に対するものおよび保護基の除去に対するものの両方)は次の文献中に見出すことができるがこれは全く例示のために与えられるものでありそしてこれは包括を意図せずまたは限定する意図でもない：

- a) Schröder および Luebke, 「The Peptides」 (Academic Press) (1965)。
- b) Belleau および Malek, J. Am. Chem. Soc., **90**, 165 (1968)。
- c) Tilak, Tetrahedron Letters, 849 (1970)。
- d) Beyerman, Helv. Chim. Acta., **56**, 1729 (1973)。
- e) Stewart and Young, 「固相ペプチド合成」 (W. H. Freeman and Co.) (1969)。

式(I)のアミドのあるものはそれ自身が式(I)の中にある前駆体から調製することもできる。

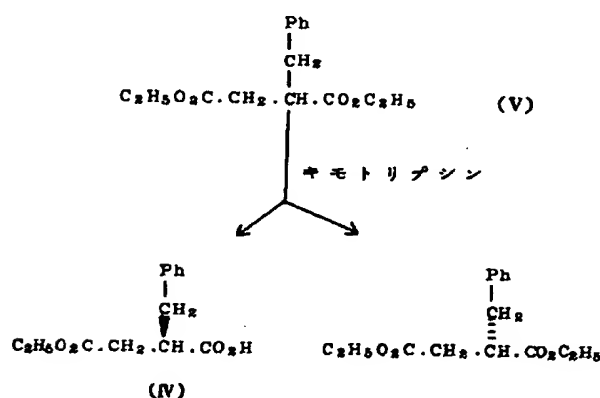
従つて、

(I) Zが $-OR^3$ でありそして R^3 が水素である化合物は R^3 がアルキル、フェニルアルキルまたはフェニルである対応する化合物の加水分解によつて調製可能である；

(II) Zが $-OR^3$ でありそして R^3 がアルキル、フェニルアルキルまたはフェニルである化合物は R^3 が水素である対応する化合物のエステル化によつて調製可能である；

(III) Zが $-NR^4R^5$ である化合物はZが $-OR^3$ でありそしてその R^3 がアルキル、フェニルアルキルまたはフェニルである対応する化合物と適切なアシモニアまたはモノ-またはジアルキルアミンとの反応によつて調製することが可能である；

(IV) Xがメルカプトである化合物はXがアルカノイルチオ、ベンジイルチオまたはフェニルアルカノイルチオである対応する化合物からメタノール性アシモニア溶液のような試薬との処理によつて

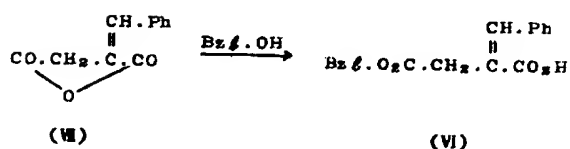


別の手順においては試薬(II)は3-ベンジロキシカルボニル-2-ベンジリザンプロピオン酸(VI)、Phは式(I)で定義される通りでありそしてBzはベンジルである)であり、これは対応するベンジリザン スクシン酸無水物(V)をCohen等、(同前)の手順に従いベンジル アルコールによつて優先的に開環させ再び要求されるカルボキシル基を与えて調製される。

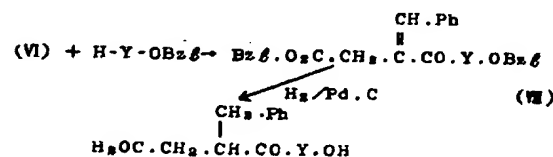
調製することが可能である。

式(I)のアミドはよく確立された技法によつてその塩基性塩に転換してよく、そしてその逆も可能である。

式(I)のアミドのあるものおよびその塩基性塩の調製においてXがカルボキシルの場合には使い易い試薬(II)はD-(+)-2-ベンジル-3-カルプエトキシプロピオン酸[(IV)、Phは式(I)中に定義する通りである]である。これは、例えば、対応するDL-ジエチル-2-ベンジルスチナート(V)をCohen等、Journal of the American Chemical Society (1968) 90, 3495, の手順に従つてキモトリプシンによつて分解することによつて得られ、酵素は必要とするカルボキシル基を選択的に明らかにする。



酸(VI)を上記に定義したような試薬(III)と反応させて(VI)を与えそして後者の二重結合は、例えば、パラジウムカーボンの存在における水素によつて還元する。水素はまたベンジロキシカルボニル基の遊離(保護されていない)カルボキシルへの転化を達成するであろう。そして[式(I)の希望するアミドがZをヒドロキシルとして有する場合に] (III)中のZ¹によつてベンジロキシであることが後者の基が同様に保護解除されるであろうから好都合である。



上に記載した標準手順が式(I)のアミドの光学異性体または中間体の混合物、例えば、ジアステレオ異性体の混合物をそれに加えて与える場合には、個々の異性体は高性能液体クロマトグラフィー、予備的薄層クロマトグラフィーおよびこれに類するもののような適切な通例の物理的技法によつて分離されるであろう。

それらの選択的エンケファリナーゼ-抑制活性のために式(I)のアミドおよびその塩基性塩は試験管内または生体内における酵素の作用様式および役割およびその位置測定、単離および精製の研究に価値の高いものである。

例えば本発明は式(I)のアミドまたはその塩基性塩をエンケファリナーゼと接触させそしてエンケファリナーゼの酵素効果に対するアミドまたは塩の抑制効果を測定することを含む方法を提供する。この方法は上記化合物のエンケファリナーゼ抑制効果を同様の効果を有する他の化合物との比較に使用することができる。本発明に従つた化合物は、要すれば、それらの抑制効果を助けるた

めに放射性同位元素によつて識別することができる。

それらの選択的エンケファリナーゼ-抑制活性はまた式(I)のアミドおよび薬理学的および薬理的に受容し得るそれらの塩基性塩に対して哺乳動物における内生的または外因的に発生するエンケファリン効果の延長および/または強化の効果を、後者の場合には合成エンケファリン類似体を含めて与える。前記のアミドおよび塩はこのように内生的化合物に対して示されたように同一活性および有用性を有する。

特に式(I)のアミドおよび薬理学的にそして薬理的に受容しうるそれらの塩基性塩はモルヒネ模倣の(モルヒネ苦悩者)活性を有し従つて人間および獣医学の医薬品の両方の分野においてモルヒネ類似の効果を持つ薬品を必要とするいずれの条件においても哺乳動物の治療に使用可能である。

モルヒネの薬理学的性質および治療上の使用は文献中によく立証されている[例えば次のものを参照のこと、「治療学の薬理学的根拠」、

Goodman, L S および Gilman, A 版、Macmillan Publishing Co., Inc., New York, 第5版 (1975) より出版、ISBN 0-02-344781-8、特に15章245頁から283頁まで、および「Martindale: The Extra Pharmacopoeia」、Wade, A 版、The Pharmaceutical Press, London、第27版 (1977) によつて出版されている、ISBN 0-85369-114-2、特に970頁から974頁まで。そして前記のアミドおよびその塩に対する特殊な効用には、例として、次のものを含む。

- 1) 苦痛の緩和(無痛覚)、例えば、腎臓のまたは胆汁の疝痛のような平滑筋のけいれんから生じる痛み、末期癌のような末期の病状における痛み、手術後の期間における痛み、および分娩痛。
- 2) 便秘の誘発、例えば、回腸瘻孔設置術または結腸造瘻術後。
- 3) 下痢または赤痢の処置。
- 4) 喉の抑圧。

5) 睡眠の誘発、特に不眠症が痛みまたは喉に基づく場合。

6) 鎮静作用、例えば手術前の不安を軽減するための前-麻酔薬の投薬。

7) 鎮静、例えば末期癌のような末期疾患の痛みの緩和と連合した場合、および一般に不安の緩和。

8) 幸福感の誘導および意気消沈の処置、例えば、末期癌のような末期疾患における痛みの緩和と連合する場合。

9) 呼吸困難の緩和、例えば、激しい残された心室の衰弱または肺性水腫の呼吸困難。

式(I)のアミドおよび薬理学的にそして薬理的に受容しうるそれらの塩基性塩(以後一括して活性成分と称する)は人間または人間以外の受容体に処置すべき条件に適切な何れかの方法で投与してよく、好適な方法には経口、直腸から、鼻から、局部に(頬側および舌下を含む)、腫瘍からおよび非経口的(皮下、筋肉内、静脈内、内皮の、包膜内および硬膜外を含む)を含む。望ましい方法は例えば受容体の条件と共に異なることが認められ

るであろう。

上に述べた実益および徴候のそれぞれに対して活性成分(上に定義したように)の必要量は処置すべき条件の強しさおよび受容体の個性を含めて多数の因子によつて決まりそして結局は付添つてゐる医師または獣医の判断によることになる。しかし一般的にはこれらの実益および徴候のそれぞれに対しては、好適かつ有効な服用量は1日当り受容体(人間または人間以外)の体重1kgにつき0.075 mg から12 mgまでの範囲、望ましくは1日当り体重1kgにつき0.75 mg から1.2 mgまでの範囲でありそして最も望ましいのは1日当り体重1kgにつき7.5 から120 mgであり; 最速服用量は1日当り体重1kgにつき30 mgである。(別に示さない限り活性成分の総ての量は式(I)のアミドとして計算し; その塩に対しては数量は比例して増加するであろう。) 必要な服用量は望ましくは1日を通して適切な間隔で投与される2回と4回の間の分割服用量として与えられる。従つて3分割服用量を用いる場合には各服用量は

特開昭56-158746(7)

一般に体重1kg当り0.025 mg から4 mgまで、望ましくは0.25 mg から0.4 mgまでそして最も望ましくは2.5 から40 mgまでの範囲に在りそして最速量は10 mgである。50kg程度の体重の人に対する日々の服用量は一般に3.75 mg から600 mgの範囲、望ましくは37.5 mg から60 mgまでの範囲そして最も望ましくは0.375 から6.0 mgの範囲に在りそして好都合なのは3単位の分割服用量1.25 mg から200 mgまで、望ましくは12.5 mg から20 mgまでそして最も望ましくは0.125 から2.0 mgまでとして与えられる。最も望ましい人間1人の毎日の服用量は50kg級の体重の個人に対しては1.5 mgであり3単位分割服用量としてそれぞれ0.5 mgとして都合よく与えられる。

活性成分を原料化学薬として投与することは可能であるが医薬品処方調合剤として与えることが望ましい。

獣医用および人間用の両方の本発明の処方物は上に記載したように活性成分と共に一つ以上の受

容し得る担体および場合によつてはその他の治療成分を含む。担体は処方のその他の成分と相容性でありそして受容者にとつて害毒を及ぼさない意味において「受容性」でなければならない。

処方には経口用、直腸用、鼻用、局部用(頰側および舌下を含む)、腫用または非経口用(皮下、筋肉内、静脈内、内皮の、包膜内および硬膜外を含む)投与に好適なものを含む。処方では都合よく単位投薬量の形で提供されそして薬学の技術において周知の何れの方法によつて調製してもよい。総ての方法は活性成分を担体に配合する段階を含み担体は一つ以上の必要成分を含む。一般に処方物は活性成分を液体担体または微粉にした固体担体またはその両方と均質にそして緊密に合体させ次いで、必要ならば生成物を成形する。

経口投与に好適な本発明の処方物はそれぞれに予め定められた量の活性物質を含有するカプセル、カシエーまたは錠剤のような分離した単位として; 粉末または顆粒として; 水性液体または非水性液体中の溶液または懸濁液として; または水中油液

体エマルションまたは油中水液体エマルションとして提供される。活性成分はまた大型丸薬、なめ薬またはペーストとしても提供される。

錠剤は加圧または圧型によつて、場合によつては一つ以上の付属成分と共に作つてもよい。圧縮錠剤は適当な機械中で粉末または顆粒のような自由流動形の活性成分を、場合によつては結合剤、滑剤、不活性希釈剤、潤滑性界面活性剤または分散剤と共に混合し加圧して調製する。成形錠剤は適当な機械中で不活性液体希釈剤によつて湿らせた粉末化合物の混合物を成形して造る。錠剤は場合によつては被覆しまたは刻み目を付けそしてその中の活性成分の緩徐なまたは調節された放出を与えるように処方することが可能である。

直腸投与の処方物はカカオ脂のような通常の担体と共に坐薬として提供する。

鼻からの投与に好適な処方物では担体が固体の場合には粒子寸法が例えば20から500ミクロンまでの範囲を有する粗粉末を含みこれを吸い込みができるように投与する。即ち鼻に近接して保

たれる粉末容器から鼻の通路を通つて急速に吸入させる。担体が液体である好適な処方物は投与には例えば鼻用噴霧または鼻の点薬として与え、活性物質の水性または油性溶液を含む。

口中の局所投与に好適な処方物は活性成分を香味をつけた基剤、通常は蔗糖とアカシアまたはトラガカントゴム、中に含むロゼンジ；および活性成分をゼラチンおよびグリセリン、または蔗糖とアカシア中に含む香錠を含む。

腫投与に好適な処方物は活性成分に加えてこの技術で適切なものとして知られている担体を含むベツサリー、クリーム、ペーストまたはスプレー処方物として提供されるであろう。

非経口的投与に好適な処方物は水性および非水性無菌注射溶液を含みこれは酸化防止剤、緩衝剤、制菌剤および意図する受容者の血液と処方物を等調ならしめる溶質を含むことが可能であり；および水性および非水性無菌懸濁液を含みこれは懸濁剤および増粘剤を含む。処方物は単位投薬量または多投薬量容器中に、例えば密封アンギュールお

よび小瓶で提供されそして凍結乾燥条件において貯蔵が可能でありそして無菌体担体の添加を要するだけで、例えば使用直前に注射のための水を加える。急ごしらえの注射溶液および懸濁液は前に記載した種の無菌の粉末、顆粒および錠剤から調製が可能である。

望ましい単位投薬量処方物は上記で述べたように日々の投薬量または単位の日々の分割投薬量、または適切なその分散の活性成分である。

上記で特に言及した成分に加えて本発明の処方物は現に問題の処方のタイプに考えられるこの技術において通例の他の薬品を含んでよく、例えば経口投与に好適な処方物は香味剤を含むであろう。

上記中または以下の文中に確認される範疇の参考文献はここに参照して記述する。

薬理学的にそして製薬上受容できない塩基性塩は標準方法によつて受容されるアミドそれ自身およびその塩に転換してよい。

前の記述から本発明はここに記載する何れの新規な特徴も含むであろうことが理解されるであら

う。主としてしかし排他的でなく例えば：

- (a) これまでに定義した式(I)のアミドおよびそれらの塩基性塩。
- (b) 上の(a)に従つた化合物の調製について前に記載した方法、併せてそのように調製した場合の化合物。
- (c) 前記で定義した通りの治療学的に有効な量の式(I)のアミドを含む薬剤処方物または薬理学的にそして製薬上受容できるその塩基性塩と併せて受容できる担体。
- (d) 定義したような活性成分を担体と共に含む上記(c)に従つた処方物の調製方法。
- (e) 哺乳動物の治療上の処置に使用するための前記に定義した通りの式(I)のアミドおよび薬理学的にそして製薬上受容できるそれらの塩基性塩。
- (f) 人間の治療上の処置に使用するための前記で定義した通りの式(I)のアミドおよび薬理学的にそして製薬上受容できるそれらの塩基性塩。
- (g) 哺乳動物の内生的または外因的エンケファリン効果の延長および／または強化に使用するための

の前記で定義した通りの式(I)のアミドおよび薬理学的にそして製薬上受容できるそれらの塩基性塩。

(h) モルヒネ様効果を持つ薬品を必要とする状態に対して哺乳動物の処置に使用するための前記で定義した通りの式(I)のアミドおよび薬理学的にそして製薬上受容できるそれらの塩基性塩。

(i) 上文で1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8)または9)の項で明確に確認したものから選ばれる状態に対する哺乳動物の処置において使用するための前記で定義した通りの式(I)のアミドおよび薬理学的にそして製薬上受容できるそれらの塩基性塩。

(j) 非毒性で治療上有効量の前に定義した通りの式(I)のアミドまたは薬理学的にそして製薬上受容できる塩基性塩の哺乳動物への投与を含む内生的または外因的エンケファリンの哺乳動物における効果の延長および／または強化のための方法。

(k) モルヒネ同様の効果を持つ薬剤を必要とする状態に対して非毒性で治療上有効量の前に定義

した通りの式(I)のアミドまたは薬理学的にそして製薬上受容できるその塩基性塩の哺乳動物への投与を含む哺乳動物の処置方法。

(i) 上文で1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8)または9)の項の下で明確に確証したものから選ばれる状態に対して非毒性で治療上有効量の前に定義した通りの式(I)のアミドまたは薬理学的にそして製薬上受容できるその塩基性塩の哺乳動物への投与を含む哺乳動物の処置方法。

(ii) 哺乳動物が人である上記(i), (k)または(ii)に記載の方法。

(iii) 前に定義した通りの式(II), (III), (IV), (V), (VI), (VII)および(VIII)の新規化合物。

以下の実施例は本発明の例証として与えられるものでいずれにしてもそれを制限するものと解してはならない。総ての値は重量である。

実施例 1

(2R)-2-[(2R)-2-ベンジル-3-カルボキシプロパンアミド]-4-メチルペンタン酸(化合物1)

釈して戸過した。戸液を0℃に冷やしそして2Nの塩酸(20.8ml)添加によつて酸性化しそして酢酸エチル(150ml)によつて2回抽出した。合併した抽出物を50%飽和の塩化ナトリウム溶液(25ml)によつて洗い、乾燥しそして蒸発させた。残留物をエーテルで粉末になし、固体を戸過しそして水性エタノールから無色の柱状に結晶させた。融点165°-167℃;

$[\alpha]_D^{25} = -22.7^\circ$, $c = 1.0$ エタノール中;

IR 0.35 μ および0.66 μ , 0.62 μ 。

分析 $C_{17}H_{25}NO_5$

必要値 C, 63.55; H, 7.17; N, 4.36%

実測値 C, 63.63; H, 7.15; N, 4.43%

実施例 2

(2R)-2-[(2R)-2-ベンジル-3-カルボキシプロパンアミド]-4-メチルペンタン酸(化合物1)

段階(a): N-[(3-ベンジロキシカルボニル-2-ベンジリジンプロパノイル)-L-ロイシンベンジルエステル

段階(a): N-[(DL-2-ベンジル-3-カルボキシプロパノイル)-L-ロイシンメチルエステル

上記のエステルを、通例の手順に従つてH-2-ベンジル-3-カルボキシプロピオン酸(5.07g)をL-ロイシンメチルエステル塩酸塩(3.90g)と共にジメチルホルムアミド(50ml)中で1-ヒドロキシベンゾチアゾール(5.80g)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(4.43g)およびトリエチルアミン(2.97ml)の存在において混合させて調製した。生成物は油(6.85g)であつた。

段階(b): (2S)-2-[(2R)-2-ベンジル-3-カルボキシプロパンアミド]-4-メチルペンタン酸

段階(a)からの油(6.85g)をメタノール(75ml)および水(8ml)中に溶かしそしてpH12.0において1Nの水酸化ナトリウムでけん化した。41.5mlのアルカリを加えた後、混合物を真空中で濃縮してメタノールを除去し、25mlの水で希

ジメチルホルムアミド(100ml)中の3-ベンジロキシカルボニル-2-ベンジリジンプロピオン酸(8.88g)の-10℃に冷やした溶液に1-ヒドロキシベンゾチアゾール(8.10g)およびジシクロヘキシルカルボジイミド(6.18g)を加えた。15分間かきまぜた後L-ロイシンベンジルエステル塩酸塩(6.73g)およびトリエチルアミン(4.15g)を加えそして+4℃で24時間攪拌を続けた。ジシクロヘキシル炭素を戸過して除きそして戸液を真空蒸発させた。残留物を酢酸エチルに溶かしそして酸/塩基洗滌を通常の様に行い、乾かしそして真空中で濃縮して油(14g)を得た。

段階(b): (2S)-2-[(2R)-2-ベンジル-3-カルボキシプロパンアミド]-4-メチルペンタン酸

段階(a)からの油(14g)を10重量%のカーボン担持パラジウム触媒(2g)の存在においてメタノール(250ml)中で水素した。水素の吸収が止つたときに触媒を戸別しそして戸液を真空

中で濃縮すると残留物を与えこれはエーテルで粉砕したときに固化しそして実施例1の生成物と同一であることが判明した。 $[\alpha]_D^{25} = -24.6^\circ$ 、 $C = 1.0$ メタノール中： R_f 0.35¹ および0.66¹、灰索／炭粉試薬を置いた場合2点は同一強度であった。

実施例3

実施例2の生成物をシリカゲルカートリッジ (Preppak 500) およびメタノール(4%)と氷酢酸(1%)を含む溶剤系メチレンジクロリドを使用しWater Associates Preparative LC (システム500) 上で分離した。成分は酸加水分解によつて次のようにその組成成分を確認した：

(2B)-2-((2R)-2-ベンジル-3-カルボキシプロパンアミド)-4-メチルペンタン酸(化合物2)； $[\alpha]_D^{25} = +24.8^\circ$ 、 $C = 1.0$ メタノール中： R_f 0.66¹；融点139-140°C、生じたのはL-ロイシンおよび(+)-ベンジルスクシン酸；および(2B)-2-((2B)-2-ベンジル-3-カルボキシプロ

パニド)-4-メチルペンタン酸(化合物3)である。 R_f 0.44¹、0.55(メチルエチルケトン)。

分析 $C_{19}H_{28}N_2O_4$ ：

必要値 C, 65.51；H, 8.05；N, 8.05%

実測値 C, 65.14；H, 8.41；N, 8.16%

段階(b)：(2B)-2-((2R)-2-ベンジル-3-カルボキシプロパンアミド)-4-メチルペンタンアミド

メタノール(45ml)および水(5ml)中の段階(a)の生成物(1.74g)をN水酸化ナトリウム(pH約12.0)を用いてけん化した。得られた生成物は慣用の手順後水性メタノールから無色柱状に晶出した、融点214-215°C；

$[\alpha]_D^{25} = -86.9^\circ$ 、 $C = 0.5$ メタノール中： R_f 0.58¹。

分析 $C_{17}H_{24}N_2O_4$ ：

必要値 C, 63.75；H, 7.50；N, 8.75%

実測値 C, 63.89；H, 7.68；N, 8.80%

実施例5

第三ブチル(2B)-2-((2RB)-3-ア

ニド)-4-メチルペンタン酸(化合物5)である。 $[\alpha]_D^{25} = -74.5^\circ$ 、 $C = 1.0$ メタノール中： R_f 0.36¹；融点199-201°C、L-ロイシンおよび(-)-ベンジルスクシン酸を生じた。

実施例4

(2B)-2-((2R)-2-ベンジル-3-カルボキシプロパンアミド)-4-メチルペンタンアミド(化合物4)

段階(a)：N-[(D)-2-ベンジル-3-カルボキシプロパノイル]-L-ロイシンアミド

上記のアミドをジメチルホルムアミド(50ml)中の(+)-2-ベンジル-3-カルボキシプロピオン酸(4.62g)、L-ロイシンアミド塩酸(3.26g)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(5.29g)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(4.05g)およびトリエチルアミン(2.71ml)から微単手順によつて調製した。生成物はジイソプロピルエーテルとイソプロパノールからの沈降によつて非晶質固体(3.71g)として単離

セチルチオ-2-ベンジルプロパン-アミド)-4-メチルペンタンアミド(化合物5)

段階(a)：DL-3-アセチルチオ-2-ベンジルプロピオン酸

2-ベンジルアクリル酸(16.2g)

(C. Mannich および K. Rieert, Ber. (1924) 57, 1116 の手順に従つてジエチルベンジルマロナートから調製される)を環境温度においてチオール酢酸(10ml)と共に1時間かきまぜた。次いで混合物を水蒸気浴上で1時間加熱し、減圧下で濃縮しそして次にベンゼン(50ml)と共に3回再蒸発させた。

残留物を無水エーテル(20ml)とヘキサン(50ml)の混合物中に溶かしそしてヘキサン(50ml)中のジシクロヘキシルアミン(19.5ml)を加えて再蒸留した。結晶ジシクロヘキシルアミン塩(33.5g)を分別しそしてヘキサンの洗った。融点102-103°C。

分析、 $C_{14}H_{17}NO_3$ ：

必要値：C, 68.74；H, 8.83；N, 3.34%

実測値: C, 68.85; H, 8.99; N, 3.13%

塩を酢酸エテル(200 ml)中に懸濁させそして水(50 ml)に溶かしした硫酸水素カリウム(16 g)と共に激しくかき混ぜた。酢酸エテル相を分離し、水(50 ml)で洗い、乾燥させ(無水硫酸ナトリウム)そして真空中で濃縮すると生成物の塩が油状(19.8 g)で得られた。

段階(b): 第三ブチル(2.8) - 2[(2.8.8) - 3 - アセチルチオ - 2 - ベンジル - プロパンアミド] - 4 - メチルペンタノアート

DL - 3 - アセチルチオ - 2 - ベンジルプロピオン酸(5.39 g)を二酸化メチレン(75 ml)中に溶かしそして-10℃に冷却した。1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール(6.11 g)とジシクロヘキシルカルボジイミド(4.66 g)を加えた。20分間かき混ぜた後、L - ロイシン 第三ブチルエステル(4.24 g)を加えそしてかき混ぜを+4℃で24時間続けた。ジシクロヘキシル尿素を分別しそして母液を真空中で濃縮した。残留物を酢酸エテル(50 ml)に溶かしそして冷却した

ウム溶液で洗い、乾かし(無水硫酸ナトリウム)そして真空中で濃縮した。ゴム状残留物(6.5 g)を酢酸エテル(30 ml)に溶かしそして再蒸留したジシクロヘキシルアミン(4.4 ml)を加えた。結晶塩を分別し酢酸エテルで洗いアセトニトリルから無色柱状結晶として再結晶させた。融点144 - 146℃; $[\alpha]_D^{25} = -16.5^\circ$, $c = 1.0$ メタノール中; R_f 0.68¹

分析 $C_{30}H_{46}N_4O_5S \cdot 1.5 H_2O$

必要値 C, 64.40; H, 9.12; N, 5.00%

実測値 C, 64.74; H, 9.00; N, 4.88%

実施例 7

(2.8) - 2 - [(2.8.8) - 2 - ベンジル - 3 - メルカプトプロパンアミド] - 4 - メチルペンタン酸、ジシクロヘキシルアミン塩(化合物 7)

実施例 6 の生成物ジシクロヘキシルアミン塩(6.2 g)を酢酸エテル(100 ml)中に懸濁させそして水(20 ml)に溶かしした硫酸水素カリウム(2.1 g)と共に激しくかき混ぜた。酢酸エテルの相を水(25 ml)で洗い、乾かし(無水硫酸

特開昭56-158746(11)

後追加の尿素を分別して除いた。母液を酢酸エテルで350 mlに希釈しそして連続的に50 mlずつの5%水性クエン酸、50% - 飽和塩化ナトリウム、飽和炭酸水素ナトリウムおよび50% - 飽和塩化ナトリウムの各溶液で洗った。溶液を乾かし(無水硫酸ナトリウム)そして真空中で濃縮して結晶固体を得、これを軽質石油から再結晶させた。融点80 - 81℃。

実施例 6

(2.8) - 2 - [(2.8.8 - 3 - アセチルチオ - 2 - ベンジルプロパンアミド) - 4 - メチルペンタン酸、ジシクロヘキシルアミン塩(化合物 6)

実施例 5 の第三ブチル エステル生成物(9 g)を再蒸留した三弗化酢酸(100 ml)およびアニソール(50 ml)と共に環境温度において1時間かき混ぜた。混合物を真空中で濃縮しそして残留物を飽和炭酸水素ナトリウム溶液および酢酸エテル(250 ml)間に分配した。水性相を酸性化しそして酢酸エテル(150 ml)によつて2回抽出した。合併した抽出液を50% - 飽和塩化ナトリ

ウム)そして真空中で濃縮した。

残留物(4.1 g)をアルゴン雰囲気中でメタノール(50 ml)中の5.5 Nアンモニアと共に2時間かき混ぜた。溶液を真空中で濃縮した。残留物を酢酸エテル(100 ml)中に溶かしそして連続的に15 ml宛の5%水性クエン酸および50% - 飽和塩化ナトリウム溶液によつて振盪した。溶液を乾燥させた後真空中で濃縮した。残留物をアルゴン下でエーテル(25 ml)中に溶かしそして再蒸留したジシクロヘキシルアミン(1.3 ml)を加えた。結晶ジシクロヘキシルアミン塩を無色柱状結晶として分別しそしてエーテルおよび軽質石油で洗った。融点154 - 155℃;

$[\alpha]_D^{25} = -34.2^\circ$, $c = 0.7$ メタノール中; R_f 0.68¹。

分析 $C_{30}H_{46}N_4O_5S$:

必要値 C, 68.57; H, 9.39; N, 5.71%

実測値 C, 68.19; H, 9.17; N, 5.61%

生成物は -8 H に対してアルカリ性ナトリウムニトロプルシッドによりおよびナトリウム アジ

ド/沃素溶液により陽性反応を与えた。

実施例 8

(2 R) - 2 - ((2 R B) - 3 - アセチルチオ - 2 - ベンジルプロパンアミド) - 4 - メチルペンタンアミド (化合物 8)

D L - 3 - アセチルチオ - 2 - ベンジルプロピオン酸 [実施例 5、(a) 段階] (4.82 g)、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール (5.47 g) およびジシクロヘキシルカルボジイミド (4.17 g) の混合物を -10℃ において 30 分間ジメチルホルムアミド (60 ml) 中でかき混ぜた。L - ロイシンアミド塩酸塩 (3.37 g) およびトリエチルアミン (2.80 ml) を加え、攪拌を +4℃ において 24 時間続けた。ジシクロヘキシル尿素を濾別し、母液を真空中で濃縮した。残留物を酢酸エチルに溶かし、濾過し、通常の方法で行った。溶剤を蒸発させ、残留物をイソプロパノール/ジイソプロピル エーテルから再結晶させると無色柱状結晶を与える。
融点 128 - 130℃。

ンアミド (化合物 10)

この物質は対応する (2 R) - 2 - (2 R) 化合物 4 (実施例 4) と類似の方法で、代りに D - ロイシンアミド塩酸塩を第一段階に使用して調製した。

生成物は無色柱状結晶として得られた。融点 212 - 214℃; $(\alpha)_D^{25} = +94.3^\circ$, $C = 0.5$ メタノール中; Rf 0.58¹, 0.48²。

分析 $C_{17}H_{24}N_2O_6$ 。

必要値 C, 63.75; H, 7.50; N, 8.75%

実測値 C, 63.58; H, 7.20; N, 8.60%

実施例 11

実施例 1 に説明したのと類似の手順によつて、段階 (a) 中の L - ロイシン メチル エステル塩酸塩の代りにそれぞれ D - ロイシン メチル エステル塩酸塩、D - メチオニン メチル エステル塩酸塩および L - メチオニン メチル エステル塩酸塩を代用して、次のものを調製した:

(2 R) - 2 - ((2 R B) - 2 - ベンジル - 3 - カルボキシプロパンアミド) - 4 - メチルペ

分析 $C_{20}H_{29}N_3O_3$

必要値 C, 61.71; H, 7.43; N, 8.00%

実測値 C, 61.85; H, 7.27; N, 8.35%

実施例 9

(2 R) - 2 - ((2 R B) - 2 - ベンジル - 3 - メルカプトプロパンアミド) - 4 - メチルペンタンアミド (化合物 9)

実施例 8 の生成物 (3.65 g) をアルゴン下でメタノール (50 ml) 中の 5.5 N アンモニアと 2 時間かき混ぜた。混合物を真空中で濃縮し、残留物を水で粉砕し、固体を濾別し、水溶性イソプロパノールから再結晶させると無色針状結晶を得る。融点 145℃; $(\alpha)_D^{25} = -45.1^\circ$, $C = 1.0$ メタノール中; Rf 0.30⁴。

分析 $C_{16}H_{24}N_2O_3S$, 0.5 H₂O

必要値 C, 60.57; H, 7.89; N, 8.83%

実測値 C, 60.44; H, 7.45; N, 8.38%

実施例 10

(2 R) - 2 - ((2 R) - 2 - ベンジル - 3 - カルボキシプロパンアミド) - 4 - メチルペンタ

ンタン酸 (化合物 11);

無色柱状、融点 164 - 166℃;

$(\alpha)_D^{25} = +25.7^\circ$, $C = 0.5$ メタノール中;

Rf 0.35¹ および 0.66¹, 0.21²。

分析 $C_{17}H_{23}NO_5$;

必要値 C, 63.55; H, 7.17; N, 4.36%

実測値 C, 63.42; H, 7.12; N, 4.43%

(2 R) - 2 - ((2 R B) - 2 - ベンジル - 3 - カルボキシプロパンアミド) - 4 - (メチルチオ) プタン酸 (化合物 12);

無色柱状、融点 131 - 134℃ (分解);

$(\alpha)_D^{25} = +14.9^\circ$, $C = 1.0$ メタノール中;

Rf 0.35¹ および 0.43¹, 0.51², 0.63³。

分析 $C_{16}H_{21}NO_5S$;

必要値 C, 56.64; H, 6.19; N, 4.13%

実測値 C, 56.61; H, 6.24; N, 4.13%

(2 R) - 2 - ((2 R B) - 2 - ベンジル - 3 - カルボキシプロパンアミド) - (メチルチオ) プタン酸 (化合物 13);

無色柱状、融点 137 - 139℃;

$(\alpha)_D^{25} = -7.48^\circ$ 、 $c = 0.5$ メタノール中；
Rf 0.35¹ および 0.43¹；0.51²；0.69³。
分析 $C_{16}H_{21}NO_8$

必要値 C, 56.64；H, 6.19；N, 4.13%

実測値 C, 56.61；H, 6.26；N, 4.15%

実施例 12

(2R)-2-[(2R,8)-3-カルボキシ-2-(4-ニトロベンジル)プロパンアミド]-4-メチルペンタン酸 (化合物 14)

ジエチル ベンジルマロナートを発酵菌酸によつて処理して調製したジエチル (p-ニトロベンジル) マロナートを p-ニトロベンジル-スクシン酸に、そしてそこからジエチル (p-ニトロベンジル) スクシナートに通常の手順によつて転換しそして後者のジエステルを Cohen 等、J.A.C.B. (1968) 90, 3495 に従つてキモトリプシンによつて分解した。それによつて得た (+)-3-カルバエトキシ-2-(4-ニトロベンジル) プロピオン酸を L-ロイシン メチルエステル塩酸塩と通常の方法で 1-ヒドロキシベンゾトリア

ゾトリアゾール (5.4 g) およびジシクロヘキシルカルボジイミド (4.11 g) を加えた。1 時間後に、D-メチオニン 第三ブチル エステル (4.09 g) を加えそして攪拌を +4℃ で一晩続けた。混合物をろ過しそしてろ液を真空中で濃縮した。残留物を酢酸エチル (350 ml) 中に溶かしそして連続的に 50 ml 宛の 50% 飽和の塩化ナトリウム溶液；5% ぐえん酸溶液；飽和炭酸水素ナトリウム；50% 飽和塩化ナトリウム溶液で洗った。溶液を乾かし ($MgSO_4$) そして真空中で濃縮して油 (8.0 g) を得た。Rf 0.82³；0.79⁴；0.88⁵。

段階 (b) (2R)-2-[(2R,8)-3-アセチルチオ-2-ベンジルプロパンアミド]-4-(メチルチオ)ブタン酸

(a) 段階で得た油をアニソール (50 ml) 中に溶かし、三弗化酢酸 (100 ml) を加えそして溶液を環境温度において 2 時間かきませた。混合物を真空中で濃縮して油状残留物 (6.97 g) を得た。Rf 0.76⁶

特開昭 56-158746 (13)

ゾールおよびジシクロヘキシルカルボジイミドの存在下で反応させそしてその結果生じた保護された生成物を N 水酸化ナトリウムによつてけん化して標記の化合物を生じた。

無色柱状、融点 143-145℃；

$(\alpha)_D^{25} = -23.6^\circ$ 、 $c = 0.5$ メタノール中；
Rf 0.30¹ および 0.67¹、0.46²

分析 $C_{17}H_{23}N_2O_7$

必要値 C, 55.74；H, 6.01；N, 7.65%

実測値 C, 55.97；H, 6.28；N, 7.99%

実施例 13

(2R)-2-[(2R,8)-2-ベンジル-3-メルカプトプロパンアミド]-4-(メチルチオ)ブタン酸 (化合物 15)

段階 (a) 第三ブチル (2R)-2-[(2R,8)-3-アセチルチオ-2-ベンジルプロパンアミド]-4-(メチルチオ)ブタノアート

3-アセチルチオ-2-ベンジルプロピオン酸 (4.75 g) を二塩化メチレン (75 ml) 中に溶かし-10℃ に冷却しそして 1-ヒドロキシ-ベ

段階 (c) (2R)-2-[(2R,8)-2-ベンジル-3-メルカプト-プロパンアミド]-4-(メチルチオ)ブタン酸

(b) 段階で得た油状残留物を環境温度においてアルゴン下でメタノール (75 ml) 中の 5.08 N アニモニアと共に 2 時間かきませた。溶液を真空中で蒸発させそして残留物を酢酸エチル (125 ml) に溶かし、15 ml 宛の 5% ぐえん酸溶液および 50% 飽和塩化ナトリウム溶液で洗い、乾かし ($MgSO_4$) そして真空中で濃縮して油を得た。

この油を無水エーテル (50 ml) に溶かしそしてジシクロヘキシルアミン (3.2 ml) を加えた。145℃ でかきませた後沈澱をろしそして乾かした。融点 155℃； $(\alpha)_D^{25} = +7.9^\circ$ ($c = 0.5$ メタノール中)；Rf 0.70⁶。

分析 $C_{27}H_{44}N_2O_5S_2$ ：

必要値：C, 63.78；H, 8.66；N, 5.51%

実測値：C, 63.86；H, 8.94；N, 5.50%

以下の実施例においては、Rf 数値は Merck シリカゲル プレートおよび下記の溶剤系を使用す

る薄層クロマトグラフィーを称する：

- 1) クロロホルム：メタノール：5% (V/V) 酢酸
(120:90:5)
- 2) クロロホルム：メタノール：5% アンモニア
(120:90:5)
- 3) n-ブタノール：酢酸：水(3:1:1)
- 4) クロロホルム：メタノール(8:1)
- 5) メチル エテル ケトン
- 6) クロロホルム：メタノール：32% 酢酸
(120:90:5)

試験管内での活性

化合物は以下の方法を使用してエンケファリナーゼ抑制活性について調べた。

A) 下記の手順に従って精製したエンケファリナーゼAを得た (Gorenstein and Snyder, Life Science, 25巻, 2065-2070頁, 1979の方法の改良法)。

ねずみを断頭によつて殺しそして線条体(striata)を氷上で切断した。一緒にした組織をよく冷えたトリス/塩酸緩衝液(50 mM,

pH 7.70、組織のg当り30 ml)中で均質化しそして遠心分離した(50,000 g 15分)。その結果生じた上部の液を廃棄しそして残留小球(ペレット)を3回洗った。洗ったペレットを前の半分の容量で1.0容量%のTriton X-100を含む緩衝液に溶かしそして37℃において45分培養した。懸濁物を次に100,000 gで60分間遠心分離にかけそして上液中に含まれる溶解した酵素をDEAE-セルロース カラム クロマトグラフィーによつて分離した。エンケファリナーゼAはさらにSephacryl S. 300クロマトグラフィーによつて精製した。

エンケファリナーゼ-抑制活性は下記の手順によつて評価した。1.75 μlのロイシン エンケファリン(0.317 μg/ml)、0.5 μlの³H-ロイシン エンケファリン([チロシン-3, 5-³H]エンケファリン(5-L-ロイシン)、The Radiochemical Centre, Amersham, England)および前のような緩衝液5.75 μlを30℃において10分間2 μlの試験化合物の溶液(50%エタノール

ル/0.1 M炭酸水素ナトリウムまたは蒸留水の何れかの中)または対照実験としての溶剤単独と共に培養した。10 μlの精製したエンケファリナーゼAを30℃において加えそして培養をさらに30分間継続した(全培養時間40分、最終ロイシン エンケファリン濃度 5×10^{-5} M、最終³H-ロイシン エンケファリン濃度12.5 μCi/ml)。培養の完了時に3 μlの0.16 M塩酸を加えそして培養混合物を氷上で冷やした。

(a)未変換³H-ロイシン エンケファリンおよび培養混合物中のエンケファリナーゼAによつて(a)から生じた(b)³H-Tyr-O-Gly-O-Gly-OH(³H-TGG)の分離は薄層クロマトグラフィーによつて(0.1 mm厚のプラスチックシリカゲルプレート、溶剤系酢酸エチル：プロパン-2-オール：5容量%酢酸、2:2:1)相体として³H化合物の溶液を使用して達成した。乾燥後物質をニンヒドリンによつて視覚化しそして適切なプレートの面積を切り取つて³Hレベルを溶出するための50%メタノール/0.1 M塩酸を含有するシンテ

レーション小瓶中に置いた。次いでピオフラワー(bioflour)試薬(10 ml)を加えそして液体シンレーション計数によつて放射能を測定した。

試験化合物の存在において発生した³H-TGG(対照実験数値の%として表現)を次いで計算しそしておよそのIC₅₀数値(³H-TGG発生の50%抑制に必要な試験化合物の濃度)をそのあとで図表的に決定した。

B) 下記の方法はMalfroy等; Nature 276巻, 11月30日, 1978年523-526頁の方法の改良方法である。

三匹のねずみを断頭によつて殺しそして脳条体を氷上で切断した。合体した組織をよく冷えたトリス/塩酸緩衝液(50 mM, pH 7.60, 10.0 ml)中で均質化しそして遠心分離した(1000 g, 10分)。その結果生じた上澄液を再遠心分離し(47,000 g, 20分)そしてこの第二次上澄液を廃棄した。ペレットを2回洗いそして最後に前のように緩衝液(9.6 ml)中に懸濁させそしてこの懸濁液の少量(1.9 ml)を22℃で培養

した。培養を始めて5分後に20 μ gの試験化合物の溶液(前と同様の緩衝液中またはエタノール或いはジメチルスルホキシド中)または対照実験としての溶剤単独を加えさらに5分後に 3 H-ロイシン エンケファリンの溶液(The Radiochemical Centre, Amersham, England)(80 μ g、最終濃度 5×10^{-8} M、1.25 μ Ci/ μ l)を加え次いで培養をさらに30分続けた(全培養時間40分)。培養完了後N塩酸(50 μ g)を加え、混合物を沸騰水浴中で15分間加熱しそして沈殿物質を次いで遠心分離(1500g、10分)によつて除去した。

上澄液中の

- (a) 未変化 3 H-ロイシン エンケファリン、
 (b) エンケファリンによつて(a)から生じた 3 H-Tyr - Ody - Ody - OH(3 H-TGG)、
 (c) アミノペプチダーゼ(a)によつて(a)および(b)から生じた 3 H-Tyr - OH
 の分離および引続く手順は前記のA)中に記載したようにして行つた。この方法においては IC_{50}

の数値は組織の均等質中のアミノペプチダーゼ(a)により、一度生じると、 3 H-TGGの分解代謝のために近似値にすぎなくなる(前記を参照のこと)。

結果は次表中に並記するが、黒印を付けた数字はB法を使用して得たものであり、その他のものはA法を使用した。比較の目的でCaptoprilに対する IC_{50} 数値(上のA法を用いて得たもの)もまた与えてある。

化合物	近似値 IC_{50} (M)
1	1.7×10^{-6}
2	7.2×10^{-6}
3	4.0×10^{-6}
4	$> 1.0 \times 10^{-4}$
6	1.1×10^{-6}
7	1.4×10^{-7}
9	3.3×10^{-7}
10	$> 1.0 \times 10^{-4}$
11	$> 5 \times 10^{-4}$
12	1.9×10^{-6}
13	4.3×10^{-6}
14	6.5×10^{-6}
15	1.5×10^{-7}
(Captopril)	3×10^{-5}

抗痛覚活性

下記の方法を使用して化合物Iの抗痛覚活性をはつかねずみの生体内で試験した：—

方法

Siegmund等の苦悩実験(Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1957, 95: 727-731)の改良法を使用した。食塩水に懸かした化合物I、または食塩単独を下記の投与量によつて5匹のマウス群の内部脳室(i.c.v.)中に投与した。1時間または2時間後に、マウスに最初の個所に痛覚刺激、即ち0.6容量%の酢酸水溶液を注射後20分て2.5分内に示した苦悩の回数を数えた。抗痛覚化合物は苦悩の回数を減らすであろう。従つてこれを抑制の量として表わすことが可能である：

%抑制 =

$$\frac{(\text{食塩水で処置したもの}) - (\text{薬品で処置したもの})}{(\text{食塩水で処置したもの})} \times 100$$

結果

投与量 (μ g マウス)	苦悩の抑制%	
	断腹の前の時間	
	1時間	2時間
40	75	84
20	32	44
10	28	48
5	僅かに 増強する	36

調剤処方

下記の調剤処方中に使用する式(I)の化合物は上記に定義した何れの式(I)の化合物またはその塩基性塩でもよい。

A) 錠剤処方 (0.5 mg/錠剤)

式(I)の化合物	0.5 mg
とうもろこし澱粉	10 mg
ポリビニルピロリドン	2 mg
ステアリン酸マグネシウム	2 mg
乳糖	を加えて100 mg

式(I)の化合物、乳糖およびとうもろこし澱粉を

一緒に混合する。水に溶かしたポリビニルピロリドンの溶液によつて顆粒にする。顆粒を乾燥し、ステアリン酸マグネシウムを加えて錠剤に加圧する。1錠100 mg。

B) 座薬 (0.5 mg/製品)

式(I)の化合物	25 mg
座薬基剤 (Masea Esterium C)	加えて100 mg

座薬基剤を40℃で融解する。式(I)の化合物を微粉状で徐々に混入しそして均質になるまで混合する。適当な型の中に注入し、1型2gにして固まらせる。Masea Esterium Cは飽和植物脂肪酸のモノ-、ジ-、およびトリ-グリセリドから成る市販の座薬基剤である。これは Henkel International, Düsseldorf によつて販売される。

C) ペツサリー (0.5 mg/製品)

式(I)の化合物	0.5 mg
乳糖	400 mg
ポリビニルピロリドン	5 mg
ステアリン酸マグネシウム	4.5 mg

式(I)の化合物と乳糖を一緒にして混合する。50%エタノール中のポリビニルピロリドン溶液によつて顆粒にする。顆粒を乾かし、ステアリン酸マグネシウムを加え適当な形のパンチによつて加圧する。1個410 mgのペツサリーを作る。

D) 凍結乾燥注射 0.5 mg/小瓶

式(I)の化合物	0.5 mg
マンニツト	99.5 mg
注射用水を加えて	2.0 ml にする。

注射用水中に式(I)の化合物およびマンニツトを溶かす。孔寸法0.2 μ mの濾過膜を通過させて溶液を殺菌し溶液を無菌受器に集める。無菌条件下で2 ml/小瓶の無菌ガラス小瓶中に充たし凍結乾燥する。アルミニウム密封を付した無菌ゴム蓋によつて小瓶を封止する。

注射は投与に先だつて注射のための都合のよい量の水または無菌食塩水を加えて再構成する。

代理人 浅 村 昭

外4名